

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE AGRONOMIA
Ismael de Barros Lima

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE DUAS
ESPÉCIES NATIVAS DO PLANALTO CENTRAL CATARINENSE:
Vriesea reitzii E *Calibrachoa sellowiana*.**

Ismael de Barros Lima

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE DUAS ESPÉCIES NATIVAS
DO PLANALTO CENTRAL CATARINENSE: *Vriesea reitzii* E *Calibrachoa sellowiana*.**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Agronomia, do Centro de Ciências Rurais, do
Campus de Curitibanos da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito para a obtenção do
Título de Bacharel em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Lírío Luiz Dal Vesco

Curitibanos

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lima, Ismael de Barros

MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO in vitro DE DUAS ESPÉCIES
NATIVAS DO PLANALTO CENTRAL CATARINENSE: *Vriesea reitzii* E
Calibrachoa sellowiana / Ismael de Barros Lima ;
orientador, Lirio Luiz Dal Vesco , 2017.

50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2017.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Cultivo in vitro. 3. Crescimento
lento. 4. Bromeliaceae. 5. Petúnia. I. Dal Vesco , Lirio
Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação
em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
Cp: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

ISMAEL DE BARROS LIMA

MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE DUAS ESPÉCIES NATIVAS DO PLANALTO CENTRAL CATARINENSE: *Vriesea reitzii* E *Calibrachoa sellowiana*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 17 de novembro de 2017.

Prof. Dr. Samuel L. Fioreze
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lirio Luiz Dal Vesco
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Floriano Barea Pastore
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me fortalecer com fé e saúde para que nunca desista de meus objetivos.

À meu pai Pedro de Lima e minha mãe Darci de Barros Lima, os quais em momento algum deixaram de me apoiar, dizendo que tenho um inenarrável orgulho da convivência e educação que recebo deles a cada dia de minha vida.

À todos os demais integrantes de minha família que sempre me auxiliaram e incentivaram durante minha graduação.

Aos professores que tive a cada semestre, que todos os dias visam através de seu conhecimento formar futuros bons profissionais. Agradecendo em especial ao meu orientador Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco, grande pessoa com o qual tive a honra de conviver, que sempre me orientou com paciência para esclarecer minhas dúvidas, com cobranças em momentos necessários e dedicando parte de seu tempo para me auxiliar com seu conhecimento. E também agradeço ao Prof. Dr. José Floriano Barea Pastore, ao Prof. Dr. Paulo César Poeta Fermino Junior e ao Prof. Dr. Leocir José Welter por aceitarem o convite de compor minha banca examinadora.

Aos meus amigos, dentre os quais muitos passei a conhecer na graduação e contribuíram para minha formação não somente nos momentos fáceis, mas também em situações difíceis.

E também sou grato a todos os demais que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu completasse esta etapa.

“Você sabe que encontrou a felicidade quando vive um momento que não quer que acabe”

Clóvis de Barros Filho

RESUMO

A micropropagação é uma eficiente técnica de multiplicação e conservação *in vitro* de espécies vegetais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente de estabelecimento e micropropagação para duas espécies da Mata Atlântica como estratégia de conservação *in vitro*. Plantas matrizes de *Calibrachoa sellowiana* e *Vriesea reitzii* foram conduzidas em casa de vegetação climatizada. Frutos maduros de *V. reitzii* e segmentos nodais e ápice caulinares *C. sellowiana* foram desinfestadas antes da inoculação. As sementes de *V. reitzii* foram extraídas e introduzidas em diferentes meios de cultura: MS=MS isento de fitorreguladores; A4=MS + ANA (4 μ M) e A2B4=MS + ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M). Após quatro semanas as culturas foram repicadas para o meio A4 para a obtenção dos microbrotos. Segmentos nodais de *C. sellowiana* foram inoculados em diferentes meios de cultura: MS; B1=MS + BAP (1 μ M) e A1B2=MS + ANA (1 μ M) + BAP (2 μ M). Após quatro semanas as culturas foram repicadas para o meio A1B2 para a obtenção dos microbrotos. Os microbrotos obtidos das duas espécies foram a fontes de explantes para o ensaio de conservação *in vitro*, em sistema de crescimento lento. Para isto, foram testadas duas espécies (*V. reitzii* e *C. sellowiana*) combinadas com o cultivo em três meios de cultura (MS; MS+15g/L de Manitol e MS+30g/L de Manitol) e a incubação em três diferentes temperaturas de cultivo (15; 20 e 25°C). Para a micropropagação de *V. reitzii* não ocorreu diferença significativa nos diferentes tratamentos. Na conservação desta mesma espécie, a viabilidade manteve-se em 100% em oito semanas de cultivo. A temperatura de 25°C independente do meio, e o meio com 15g/L de Manitol independente da temperatura, resultaram em um baixo número de brotos. O Manitol promoveu baixa massa fresca de brotos; e a altura dos brotos é baixa na temperatura de 20°C independente do meio, bem como no meio com 30g/L de Manitol independente da temperatura. Na micropropagação de *C. sellowiana*, o meio de cultura MSA1B2 resultou em maior (42,5%) e significativa ($p<0,05$) porcentagem média de indução de CN e número de brotos (2,0 microbrotos/explantes). Na conservação de *C. sellowiana* a viabilidade foi afetada pela presença de necrose nas folhas. O uso de meio de cultura com a adição de Manitol e ambiente de 15°C e 25°C resultaram em baixo número de brotos e massa fresca dos brotos, bem como menor altura dos brotos.

Palavras-chave: Bromeliaceae; Cultivo *in vitro*; Petúnia; Morfogênese; Crescimento lento.

ABSTRACT

Micropropagation is an efficient technique of *in vitro* multiplication and conservation of plant species. The aim of this study was to develop an efficient protocol of establishment and micropropagation for two species of Atlantic Forest as a conservation strategy *in vitro*. Matrix plants of the species *Calibrachoa sellowiana* and *Vriesea reitzii* were conducted in greenhouse climatized. Mature fruits of *V. reitzii* and nodal segments and cauline apex *C. sellowiana* were disinfected before inoculation. *V. reitzii* seeds were extracted and put into different culture mediums: MS=MS phytohormones-free; N4=MS + NAA (4 μ M) and N2B4=MS + NAA (2 μ M) + BAP (4 μ M). After four weeks the cultures were peaked to N4 to the microshoots obtainment. Nodal segments of *C. sellowiana* were inoculated in different culture mediums: MS; B1=MS + BAP (1 μ M) and N1B2=MS + NAA (1 μ M) + BAP (2 μ M). After four weeks the cultures were peaked to N1B2 to the microshoots obtainment. The microshoots obtained from two species were the sources of explants for *in vitro* conservation in slow-growing system. For this, two species were tested (*V. reitzii* and *C. sellowiana*) combined with growing in three culture mediums (MS; MS+15g/L of Mannitol and MS+30g/L of Mannitol) and incubation in three different growing temperatures (15; 20 and 25°C). There was not significant difference in the different treatments for the *V. reitzii* micropropagation. In the conservation of this species, the viability remained at 100% in eight weeks. The temperature of 25°C regardless of the medium, and the medium with 15g/L of Mannitol indifferent of the temperature, resulted in a low number of shoots. Mannitol promoted low mass of shoots; and the shoots height is low at the temperature of 20°C unconcerned of the medium, as well as in the medium with 30g/L of Mannitol regardless of the temperature. In *C. sellowiana* micropropagation, MSN1B2 culture medium resulted in increased (42.5%) and significant ($p<0.05$) average percentage of induction of NC and number of shoots (2.0 microshoots/explants). In the *C. sellowiana* conservation, the viability was affected by the presence of necrosis in leaves. The culture medium with Mannitol and the temperature of 15°C and 25°C showed a low number of shoots and fresh mass in it, as well as a lower height of the shoots.

Keywords: Bromeliaceae; *In vitro* culture; Petunia; Morphogenesis; Slow growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da família Bromeliaceae.....	19
Figura 2 - Distribuição de <i>Vriesea reitzii</i> Leme & A. F. Costa na região Sul do Brasil.	20
Figura 3 - Cultivo e conservação <i>in vitro</i> de espécies da flora nativa do Planalto Catarinense: A) Planta matriz em jardim da UFSC/Campus de Curitibanos: A) <i>Vriesea reitzii</i> Leme & A. F. Costa; B) Folhas de <i>V. reitzii</i> ; C) <i>V. reitzii</i> em habitat natural; D) Cápsulas de <i>V. reitzii</i> ; E) Fruto tipo cápsula de <i>V. reitzii</i> ; F) Indução de Culturas Nodulares (CNs) em <i>V. reitzii</i> , em MS suplementado com ANA (2µM) + BAP (4µM), após quatro semanas em cultivo e; G) Brotos de <i>V. reitzii</i> em meio MS suplementado com ANA (4µM); H-I) Sistema de conservação <i>in vitro</i> por crescimento lento. Barra: A=10 cm; E= 2,0cm; F-I = 1,0 cm.	21
Figura 4 - Porcentagem média de indução de culturas nodulares (CN) a partir de sementes de <i>V. reitzii</i> em relação aos diferentes meios de cultura utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; A4=MS + ANA (4µM) e A2B4=MS + ANA (2µM) + BAP (4µM), em quatro semanas de cultivo. *Valores com mesma letra não diferem para o teste SKN (5%). CV% = 36.46.	24
Figura 5 - Número médio de microbrotos por explante de <i>V. reitzii</i> em relação aos diferentes meios de cultura utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; MSA4=MS + ANA (4µM) e MSA2B4=MS + ANA (2µM) + BAP (4µM), em sete semanas de cultivo. *Valores com mesma letra não diferem para o teste SNK (5%). CV (%)= 25,34.	24
Figura 6 – Massa fresca (g) de Culturas Nodulares e de Brotos na proliferação de <i>Vriesea reitzii</i> em diferentes meios de cultivo.	27
Figura 7 - Altura média dos brotos (cm) de <i>V. reitzii</i> sob conservação <i>in vitro</i> em relação ao meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) e em diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após oito semanas de cultivo. Valores com letras diferentes diferem para o teste de Tukey (5%). Letras minúsculas comparam os três diferentes	

meios para cada temperatura isolada. Letras maiúsculas comparam o mesmo meio nas três diferentes temperaturas.....28

Figura 8. Cultivo e conservação *in vitro* de espécies da flora nativa do Planalto Catarinense: A) Comportamento decumbente de *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman B) Planta matriz em jardim da UFSC/Campus de Curitiba: B) *C. sellowiana*, detalhe da flor; C) Matriz de *C. sellowiana* em vaso e mantida em casa de vegetação; D) Folhas sésseis *C. sellowiana*; E) Flor de *C. sellowiana*; F-G) Sistema de conservação *in vitro* por crescimento lento: F) Brotos de *C. sellowiana* G) Brotos de *C. sellowiana* com necrose. H) Indução *C. sellowiana* de microbrotos e CNs de *C. sellowiana* em MS suplementado com ANA (1µM) mais BAP (2µM); Barra: B=10 cm; C, F-H = 1,0 cm.33

Figura 9 - Porcentagem média de indução de CN por explante de *C. sellowiana*, em relação aos diferentes meios de cultura utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; MSB1=MS + BAP (1µM) e MSA1B2=MS + ANA (1µM) + BAP (2µM), em sete semanas de cultivo em relação ao meio de origem. * Valores com letras diferentes diferem para o teste SNK (5%). CV (%)= 37,72; dados transformados em Log (x+2).....36

Figura 10 - Número médio de brotos por explante de *C. sellowiana* em relação aos diferentes meios na cultura: utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; MSB1=MS + BAP (1µM) e MSA1B2=MS + ANA (1µM) + BAP (2µM), em sete semanas de cultivo em relação ao meio de origem. * Valores com mesma letra não diferem para o teste SNK (5%). CV (%)= 22,97; dados transformados em Log (x+2).....36

Figura 11 - Média do número de microbrotos de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro*, relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam os três diferentes meios para cada temperatura isolada. Letras maiúsculas comparam o mesmo meio nas três diferentes temperaturas.39

Figura 12 - Média do número de nós por broto de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro*, em relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de

cultivo. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média do número de brotos de <i>V. reitzii</i> sob conservação <i>in vitro</i> em relação ao meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) e em diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após quatro semanas de cultivo.....	25
Tabela 2 - Média do número de brotos de <i>V. reitzii</i> sob conservação <i>in vitro</i> em relação ao meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) e em diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após oito semanas de cultivo.....	26
Tabela 3 - Média da massa fresca de brotos (g) de <i>V. reitzii</i> em sistema de conservação <i>in vitro</i> , cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.	26
Tabela 4 - Viabilidade média das folhas <i>C. sellowiana</i> em sistema de conservação <i>in vitro</i> relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após quatro e oito semanas de cultivo.	37
Tabela 5 - Viabilidade média das folhas <i>C. sellowiana</i> em sistema de conservação <i>in vitro</i> relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C) após oito semanas de cultivo.	38
Tabela 6 - Viabilidade média das folhas <i>C. sellowiana</i> em sistema de conservação <i>in vitro</i> cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.	39
Tabela 7 - Média do número de microbrotos de <i>C. sellowiana</i> em sistema de conservação <i>in vitro</i> , relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após quatro e oito semanas de cultivo.....	39
Tabela 8 - Média da massa fresca de brotos (g) de <i>C. sellowiana</i> em sistema de conservação <i>in vitro</i> relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C) após oito semanas de cultivo.....	40

Tabela 9 - Média da massa fresca de brotos (g) de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.40

Tabela 10 - Média da altura dos brotos (cm) de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA – Ácido Naftalenoacético

ANOVA – Análise de Variância

BAP – Benzilaminopurina

CN – Cultura Nodulares

CNCFlora – Centro Nacional de Conservação da Flora

DBC – Delineamento em Blocos Casualizados

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

FOM - Floresta Ombrófila Mista.

MS – Murashige; Skoog, 1962

MS/2 – MS com a metade das concentrações de sais

MSA1B2 – MS suplementado com ANA (1 μ M) + BAP (2 μ M)

MSA2B4 – MS suplementado com ANA (2 μ M) mais Benzilaminopurina-BAP (4 μ M)

MSA4 – MS suplementado com Ácido Naftalenoacético-ANA (4 μ M)

MSB1 – MS suplementado com BAP (1 μ M)

SNK – Student-Newman-Keuls

UCs – Unidades de Conservação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
1.2	JUSTIFICATIVAS.....	17
2	CAPITULO 1- MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Vriesea reitzii</i> Leme & A.F. Costa.....	19
2.1	INTRODUÇÃO.....	19
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1	Ensaio de indução e proliferação das culturas.....	22
2.2.2	Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento	22
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
2.4.1	Ensaio de indução e proliferação das culturas.....	23
2.4.2	Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento	24
2.4.2.1	Viabilidade e número de brotos.....	24
2.4.2.2	Massa fresca e altura de brotos.....	26
2.5	CONCLUSÕES.....	28
	REFERÊNCIAS	28
3	CAPITULO 2- MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Calibrachoa sellowiana</i> (Sendtn.) Wijsman	32
3.1	INTRODUÇÃO.....	32
3.1.1	Ensaio de indução e proliferação das culturas.....	34
3.1.2	Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento	34
3.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.3.1	Ensaio de indução e proliferação das culturas.....	35

3.3.2	Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento	37
3.3.2.1	Viabilidade e número de brotos.....	37
3.3.2.2	Massa fresca, altura e número de nós por broto	40
3.4	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A – Exemplar da Planilha utilizada para a avaliação da indução e proliferação de <i>Vriesea reitzii</i> nos diferentes meios de cultivo utilizados.....	44
	APÊNDICE B – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de <i>Vriesea reitzii</i> nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 4 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.	45
	APÊNDICE C – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de <i>Vriesea reitzii</i> nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 8 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.	46
	APÊNDICE D – Planilha utilizada para a avaliação da indução e proliferação de <i>Calibrachoa sellowiana</i> nos diferentes meios de cultivo utilizados.	47
	APÊNDICE E – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de <i>Calibrachoa sellowiana</i> nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 4 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.	48
	APÊNDICE F – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de <i>Calibrachoa sellowiana</i> nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 8 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.	49
	ANEXO A – Componentes do meio de cultura básico de Murashige & Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962).	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

Este estudo visa a micropropagação bem como a conservação através do cultivo *in vitro* em sistema de crescimento lento de duas espécies, sendo uma pertencente à família Bromeliaceae e outra à família Solanaceae, ambas endêmicas da Mata Atlântica.

A Mata Atlântica é um bioma brasileiro que está presente em 17 estados, abrangendo desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, com boa predominância na faixa litorânea brasileira (CÂMARA; GALINDO, 2005). Inicialmente este bioma possuía uma área de aproximadamente 1,3 milhões de Km² (15% da extensão territorial brasileira), é o terceiro maior bioma nacional e detém a segunda maior abundância da flora brasileira (SANTOS, 2010).

Muito da sua flora foi intensamente devastada durante a colonização do Brasil e ainda nos dias de hoje a fauna e a flora deste bioma vem sendo ameaçados com a atividade humana sem mensurar as suas consequências (CÂMARA; GALINDO, 2005).

Um exemplo da perda da vegetação é identificado na região sul do Brasil, onde principalmente na chamada floresta das araucárias e/ou Floresta Ombrófila Mista, é visível um significativo menor número de araucárias bem como vários outros tipos de vegetações características da região bem como do bioma. A vegetação natural, foi devastada ao longo do tempo, principalmente devido a implantação da pecuária e posterior prática agrícola, algo ainda ocorrente nos dias atuais (ALMEIDA, 2009).

Como consequência, restam apenas 27% de remanescentes da Mata Atlântica, sendo encontrados sobre diferentes estágios de desenvolvimento e regeneração (CAMPANILI; SCHÄFFER, 2010).

Dentro do atual remanescente existem mais de 20 mil espécies vegetais, dessa maneira aparentemente o cenário não é dos piores, mas o problema é que podemos chamar de bem conservadas apenas 7,26% das espécies; logo medidas devem ser tomadas para que este valor não se torne cada vez menor com o passar dos dias, sendo importante ressaltar que boa parte destas espécies são endêmicas (CAMPANILI; SCHÄFFER, 2010).

Dentre as plantas endêmicas muitas espécies estão presente na família Bromeliaceae, como por exemplo, a espécie *Vriesea reitzii* Leme & A.F. Costa (Fig. 3A), que assim como muitas outras bromélias caracterizam-se por serem plantas emblemáticas da Mata Atlântica. A *V. reitzii* é uma espécie epífita endêmica da Floresta Ombrófila Mista com potencial

ornamental e que apresenta limitações quanto a sua propagação (MOREIRA; WANDERLEY; BARROS; 2006).

Outra espécie endêmica da Região Sul, igualmente presente na Floresta Ombrófila Mista e também com potencial ornamental é a espécie *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman, pertencente à família Solanaceae e popularmente conhecida como petúnia (ALMEIDA, 2009).

A *C. sellowiana* ocorre em áreas perturbadas e antrópicas, possuindo uma vegetação arbustiva campestre que chama a atenção com suas flores coloridas (Fig. 8E) (ALMEIDA, 2009). Tanto para esta espécie, quanto para a espécie anteriormente citada, uma boa técnica para propagar ambas, é a utilização da micropropagação através do cultivo *in vitro*, pois a micropropagação é uma ótima ferramenta para a conservação de espécies endêmicas.

A partir do cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais, através do cultivo *in vitro*, o que permite rápidos resultados através de micropropagação, já que as condições desejadas podem ser controladas (CARDOSO, 2014), sendo que todo o trabalho é iniciado com obtenção de explantes da cultura que se deseja estudar.

Um explante corresponde a um segmento de tecido ou órgão vegetal. A capacidade de regeneração de uma planta ocorre devido à totipotência, ou seja, é devido a capacidade que as células têm de formar um novo indivíduo multicelular, isso estando sob estímulo (ANDRADE, 2002).

Mas vale ressaltar que para que o trabalho com a micropropagação *in vitro* possa apresentar bons resultados, é de fundamental importância escolher explantes saudáveis e ainda assim, os mesmos devem passar por um processo de desinfestação e obviamente tantas as condições físicas, quanto as fisiológicas, devem ser adequadas, de modo a propiciar que os explantes possam formar uma planta completa (CABRAL et al., 2003).

Em resumo este tipo de cultivo é uma estratégia muito eficiente da biotecnologia que favorece trabalhar com tecidos vegetais, onde se bem manejados, geram resultados relativamente rápidos e sem influências externas indesejáveis, as quais ocorrem com maior facilidade quando se trabalha à campo (ar livre), por exemplo (MALDANER, 2014). Assim após um bom processo de micropropagação é possível realizar a conservação de material genético de plantas.

A conservação através do cultivo *in vitro* atualmente é muito utilizada pelo sistema de crescimento lento, a qual resumidamente se baseia na redução do metabolismo, isso através do uso de por exemplo, fitorreguladores (fator químico) e manipulação de temperatura (fator

físico); tudo sem afetar a viabilidade das espécies com que se esteja trabalhando (LEMOS et al., 2002).

Esta técnica faz com que os cultivos em sequencias, sejam diminuídos o máximo possível, pois o metabolismo do material vegetativo com o qual se esteja trabalhando acaba sendo reduzido (LEMOS et al., 2002), onde a diminuição de temperatura é um dos principais fatores responsáveis pela redução do metabolismo (SILVA et al., 2016).

Com tudo ao manipularmos concentrações de sais, reguladores, temperatura, incidência de luz, dentre outros fatores, é possível suprimir o desenvolvimento de órgãos, tecidos e até mesmo de células (SILVA et al., 2016 e LEDO et al., 2011).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo eficiente de estabelecimento e micropropagação para duas espécies da mata atlântica como estratégia de conservação *in vitro*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar e coletar plantas matrizes de *V. reitzii* e *Calibrachoa sellowiana*, presentes do Planalto Catarinense, com potencial para a introdução e estabelecimento das culturas *in vitro*;
- Desenvolver protocolos de micropropagação, através da indução de sistemas avançados de cultivo *in vitro*, de alta eficiência regenerativa, através do cultivo em meios de cultura, com diferentes concentrações, combinações e tipos de fitorreguladores;
- Identificar estratégias para a conservação *in vitro* em crescimento lento das espécies.

1.2 JUSTIFICATIVAS

A finalidade do trabalho justifica-se pela coleta e identificação de plantas, principalmente endêmicas, medicinais e ornamentais presentes na Floresta Ombrófila Mista; exemplares estes que tornar-se-ão matrizes através do cultivo em casa de vegetação, servindo

posteriormente como fonte de explantes para serem utilizados no cultivo *in vitro*, estabelecendo a micropropagação e conservação das espécies a serem trabalhadas.

Além disto, é relevante também, pois o presente estudo possibilita um maior conhecimento sobre determinadas tecnologias que podem auxiliar na conservação e/ou minimizar as ameaças sobre espécies que estão em risco na região do Planalto Catarinense.

2 CAPIULO 1- MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Vriesea reitzii*

Leme & A.F. Costa

2.1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae abriga plantas herbáceas que podem variar desde poucos centímetros até mais de dez metros de altura, suas folhas são alternadas e espiraladas, com cores que variam do verde ao vermelho e normalmente formando cisternas de armazenamento de água; possui uma inflorescência que chama atenção devido a presença de brácteas e geralmente com um elevado número de flores, possuindo frutos do tipo baga ou capsula (WANDERLEY; MARTINS, 2007).

É uma família composta por mais de 3.200 espécies, as quais são divididas em 58 gêneros e devido mudanças e descobertas taxinômicas, o número de espécies se altera com frequência (WANDERLEY; MARTINS, 2007 e SOARES, 2013).

É uma das maiores famílias em relação as Angiospermas e é encontrada predominantemente no continente Americano (Fig. 1); somente a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed é encontrada na região africana, todas as demais espécies ocorrem entre a América do Sul, do Norte e Central (SOARES, 2013).

No Brasil encontra-se muitas bromélias no estado de Santa Catarina, com destaque para o gênero *Vriesea* Lindl., onde são encontradas 38 espécies do gênero pelo estado (FLORA DO BRASIL, 2017).



Figura 1 - Distribuição geográfica da família Bromeliaceae. **Fonte:** (PESSOTI, 2010).

Dentre as 38 espécies encontradas em Santa Catarina, existe a espécie *Vriesea reitzii* Leme & A. F. Costa, que popularmente é chamada de Bromélia; esta espécie, foi descrita em 1991 por Raulino Reitz, famoso bromeliólogo catarinense. A *V. reitzii* é encontrada no bioma Mata Atlântica, principalmente na região sul do Brasil (Fig. 2), nas dependências da Floresta Ombrófila Mista (CNCFlora, 2012). Possui uma morfologia que muito se assemelha com a espécie *Vriesea philippocoburgii* Wawra (BÜNEKER, 2014).

A morfologia da *V. reitzii* é caracterizada por uma inflorescência com no máximo 50cm de altura com coloração amarelada, a espécie possui as primeiras brácteas na coloração que varia entre magenta e vermelho (Fig. 3A). Suas folhas são alternadas, espiraladas com coloração verde e com uma superfície bem característica (Fig. 3B). É uma planta epífita (Fig. 3C) possuindo frutos do tipo cápsula (Fig. 3D e Fig. 3E) (BÜNEKER, 2014).

Devido sua vasta beleza a planta tem um grande potencial no setor ornamental. O problema em questão é que esta espécie que é nativa da região, sofre risco de extinção, de modo que a tomada de medidas de propagação e conservação, tornam-se cruciais para evitar tal ameaça (CNCFlora, 2012), como por exemplo, utilizar o método de cultivo *in vitro*.

A ameaça de extinção além de ser um problema no que se refere a vegetação nativa, também se torna prejudicial para a fauna, pois é válido destacar que as bromélias são fundamentais para uma grande abrangência da fauna, como vários insetos, aracnídeos e pequenos répteis (ALVES, 2000).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi em desenvolver estratégias de estabelecimento e conservação *in vitro* de *V. reitzii*, espécie nativa da Floresta Ombrófila Mista (FOM).

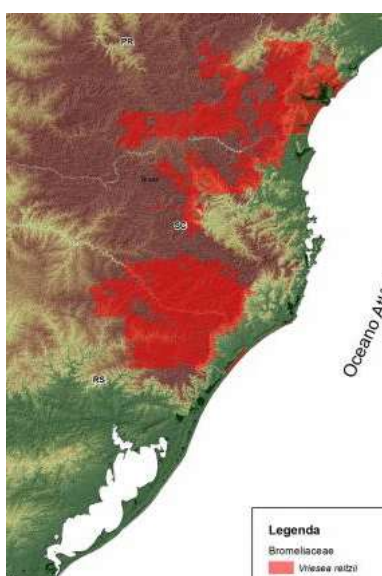


Figura 2 - Distribuição de *Vriesea reitzii* Leme & A. F. Costa na região Sul do Brasil. **Fonte:** CNCFlora, 2012.

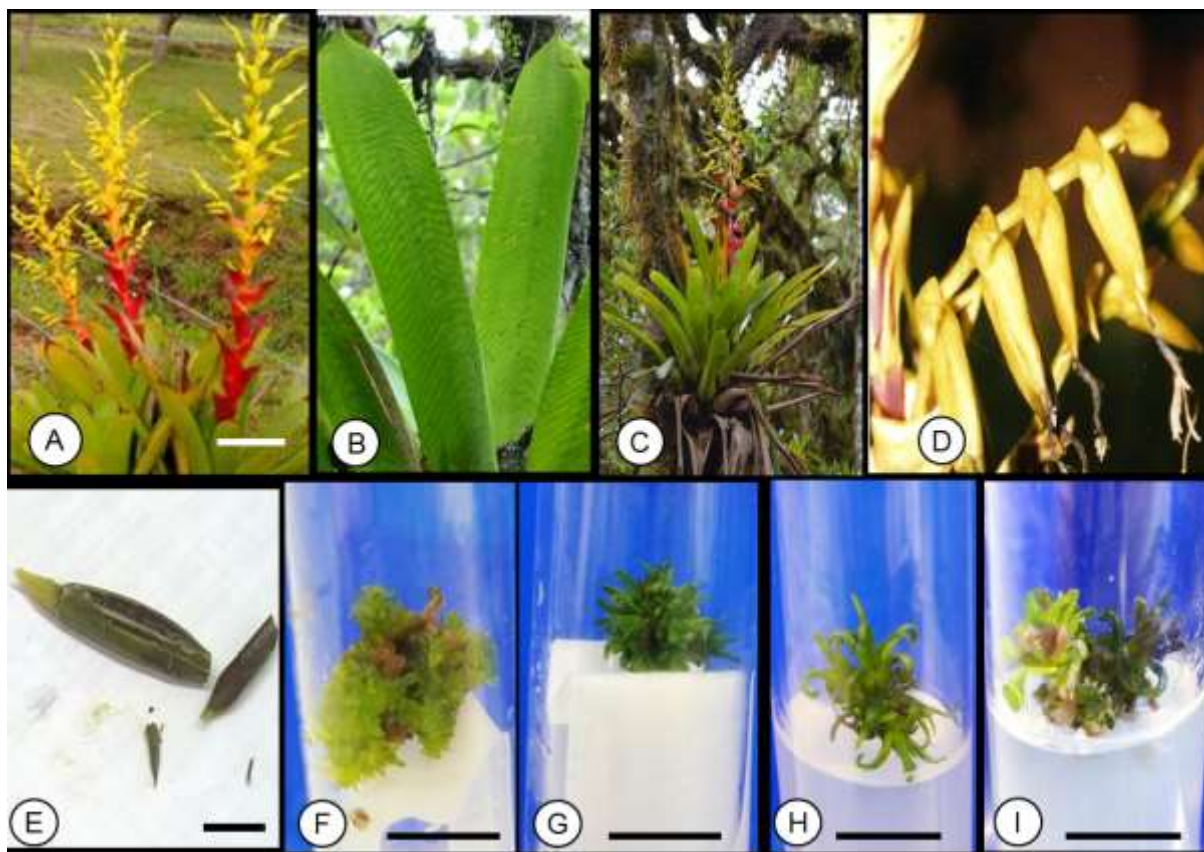


Figura 3 - Cultivo e conservação *in vitro* de espécies da flora nativa do Planalto Catarinense: **A)** Planta matriz em jardim da UFSC/Campus de Curitibanos; **A)** *Vriesea reitzii* Leme & A. F. Costa; **B)** Folhas de *V. reitzii*; **C)** *V. reitzii* em habitat natural; **D)** Cápsulas de *V. reitzii*; **E)** Fruto tipo cápsula de *V. reitzii*; **F)** Indução de Culturas Nodulares (CNs) em *V. reitzii*, em MS suplementado com ANA (2µM) + BAP (4µM), após quatro semanas em cultivo e; **G)** Brotos de *V. reitzii* em meio MS suplementado com ANA (4µM); **H-I)** Sistema de conservação *in vitro* por crescimento lento. Barra: A=10 cm; E= 2,0cm; F-I = 1,0 cm. **Fonte:** fotos B e C: Büneker (2014); D: Bagatini (2014); A e E-I: Autor.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Plantas matrizes da Bromélia- *V. reitzii* (Fig. 3A), foram coletadas na região de domínio da Floresta Ombrófila Mista e mantidas junto a UFSC/Campus de Curitibanos. Os trabalhos de cultivo *in vitro* foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia e Genética no Campus de Curitibanos/UFSC.

O meio de cultura básico utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962); adicionado 30g/L de sacarose e pH ajustado para 5,8. Em cada tubo de ensaio (18x150 mm) foi transferido 10 ml de meio de cultura e quando de consistência líquida, utilizou-se ponte de papel filtro e para o meio geleificado, adicionou-se 7,5 g/L de ágar-ágar (Guerra; Dal Vesco, 2010). Após foram vedados com papel alumínio e filme plástico, em seguida foram

autoclavados a 121 °C, a 1,3 atm., por 15-20 minutos. Após a inoculação as culturas foram mantidas em câmara de crescimento, a temperatura de 25°C sob fotoperíodo de 16 horas.

2.2.1 Ensaio de indução e proliferação das culturas

Frutos fisiologicamente maduros de *V. reitzii* (cápsulas de *V. reitzii* utilizadas como explantes), em laboratório, foram desinfestados com prévia lavagem com água corrente e sabão neutro (Tween 20) por 5 min. Em seguida, em câmara de fluxo, as cápsulas de *V. reitzii* foram imersos em álcool 70%, por 2 min, seguida da imersão em solução de água sanitária comercial a 40% (1% de NaOCl) mais uma gota de Tween 20 em cada 50 ml de solução, por 25 min. Em seguida, passaram pela tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

As sementes de *V. reitzii* foram extraídas das cápsulas e introduzidas em diferentes meios de cultura. O delineamento experimental foi o completamente ao acaso (DIC) com três tratamentos: 1) meio básico MS e isento de fitorreguladores=MS; 2) MS suplementado com Ácido Naftalenoacético-ANA (4μM) = MSA4 e; 3) MS suplementado com ANA (2μM) mais Benzilaminopurina-BAP (4μM) =MSA2B4.

Cada unidade experimental foi constituída por cinco tubos com três explante cada e quatro repetições, totalizando 60 tubos de ensaio. Dados de porcentagem de indução de culturas nodulares (CN) e número de microbrotos foram obtidos após quatro semanas de cultivo. Por mais três semanas as culturas foram repicadas para o meio MSA4 para promover a proliferação dos microbrotos, totalizando sete semanas em cultivo.

2.2.2 Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento

Os microbrotos obtidos foram a fonte de explantes para o ensaio de conservação *in vitro*, em sistema de crescimento lento. O desenho experimental foi um fatorial 3x3, com 9 tratamentos: Microbrotos de *V. reitzii* cultivados em três meios de cultura (MS/2=com a metade das concentrações de sais; MS/2 +15g/L de Manitol e MS/2 +30g/L de Manitol) e combinados com a incubação em três diferentes temperaturas de cultivo (15°C; 20°C e 25°C). Todas as culturas foram mantidas em ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz.

Cada unidade experimental foi constituída de três tubos de ensaio contendo de 2-3 microbrotos em um delineamento em blocos ao acaso (DBC) com três repetições. Dados de viabilidade das brotações e número de microbrotos foram obtidos após quatro semanas de cultivo. E após oito semanas de cultivo, foram coletados novamente dados de viabilidade e

números de brotações e além disso também foram obtidos os dados de massa fresca de brotos e altura de brotos.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados quantitativos, coletados de cada parâmetro foram compilados em planilhas do Excel e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade; sendo que quando necessário os dados originais foram transformados em $\log(x+1)$ ou $(x+0,5)^{0,5}$ e então submetidos à análise da variância; em sequência foi realizado a comparação das médias pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) ou em alguns casos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o software estatístico ASSISTAT, tais análises de acordo com as recomendações de Steel; Torrie (1980) e Compton (1994).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Ensaio de indução e proliferação das culturas

A indução de culturas nodulares (Fig. 3F) nos diferentes meios de cultivo utilizados, não apresentou diferença significativa para as sementes de *V. reitzii*, com quatro semanas após a inoculação (Fig. 4).

Rech Filho; Dal Vesco; Guerra (2009) utilizaram MS líquido com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M) para a micropropagação de *V. reitzii*, com o intuito de obter culturas nodulares em posteriores subcultivos, mostrando assim que tais fitorreguladores nas respectivas concentrações podem favorecer o desenvolvimento de nódulos.

Dal Vesco (2010) mostra que o uso de 4 μ M de ANA, junto ao meio MS apresenta uma elevada indução de culturas nodulares, onde a porcentagem de CNs foi superior a 80%, sendo um acontecimento diferente do que ocorreu no presente trabalho, onde a porcentagem de CNs no meio MSA4 foi de apenas 31,3%.

Para esta mesma espécie, também não houve diferença significativa (Fig. 5) em relação ao número médio de microbrotos por explante (Fig. 3G).

De acordo com Alves (2000), o meio composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) é um dos meios de cultura mais utilizados em vários protocolos de propagação de espécies de Bromélias com o intuito de obter grande número de microbrotos, porém este mesmo autor trabalhando com a propagação da espécie *V. friburgensis*, acabou tendo um resultado

diferente, pois dentre os meios utilizados, tal meio citado, foi o que teve um menor número de microbrotos.

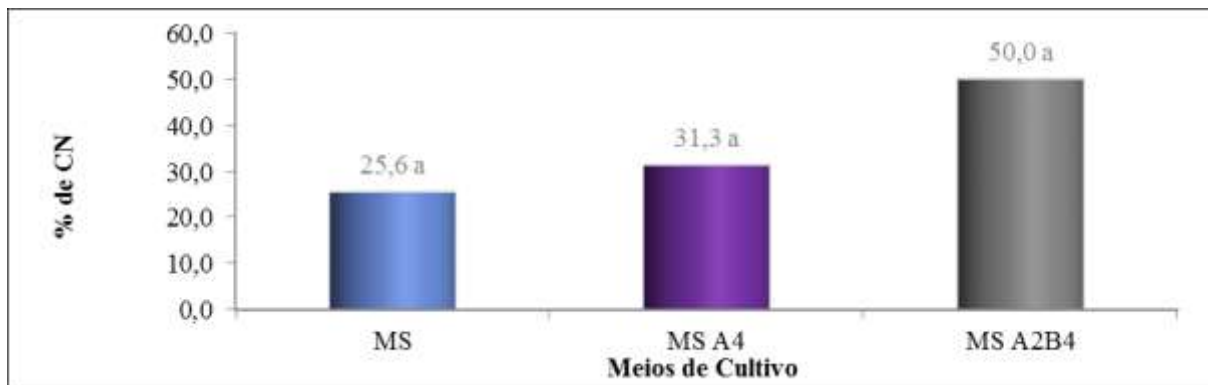


Figura 4 - Porcentagem média de indução de culturas nodulares (CN) a partir de sementes de *V. reitzii* em relação aos diferentes meios de cultura utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; A4=MS + ANA (4 μ M) e A2B4=MS + ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M), em quatro semanas de cultivo. *Valores com mesma letra não diferem para o teste SKN (5%). CV% = 36.46.

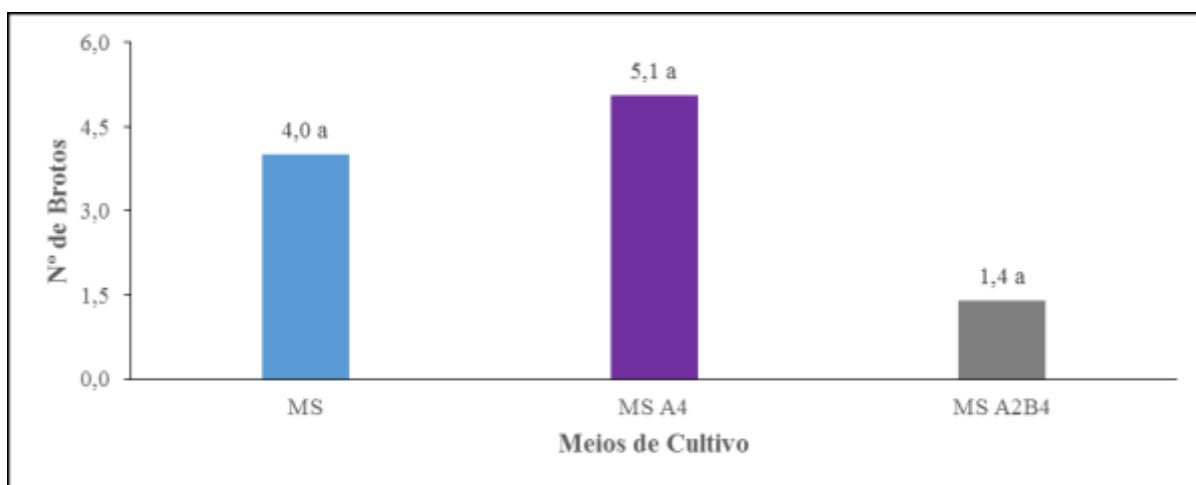


Figura 5 - Número médio de microbrotos por explante de *V. reitzii* em relação aos diferentes meios de cultura utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; MSA4=MS + ANA (4 μ M) e MSA2B4=MS + ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M), em sete semanas de cultivo. *Valores com mesma letra não diferem para o teste SNK (5%). CV (%)= 25,34.

2.4.2 Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento

2.4.2.1 Viabilidade e número de brotos

Microbrotos de *V. reitzii*, cultivados em sistema de conservação *in vitro* em crescimento lento mantiveram-se com 100% de viabilidade (Dados não mostrados; Fig. 3H). Observou-se também um baixo desenvolvimento de brotos, em relação aos três meios de

cultura, com a metade das concentrações de sais e nos três ambientes de temperatura, após quatro semanas de cultivo (Tabela 1).

Revelando, portanto, que esta espécie apresenta boa conservação dos microbrotos em relação às diferentes temperaturas de ambientes de cultivo e meios de cultura.

Passadas oito semanas de cultivo em sistema de conservação *in vitro* em crescimento lento, os microbrotos de *V. reitzii* mantiveram sua viabilidade de 100%, porém nesta segunda avaliação o desenvolvimento de brotos apresentou diferença nas interações entre os diferentes meios e temperaturas (Tabela 2); onde o menor número de brotos foi obtido nas seguintes interações: com o meio MS/2 nas temperaturas 15°C e 25°C; com o meio MS/2 com 15g/L de Manitol nas três temperaturas (15°C, 20°C e 25°C) e com o meio MS/2 com 30g/L de Manitol nas temperaturas de 20°C e 25°C.

Com a conservação em crescimento lento de *V. sucerei*, foi obtido 100% de viabilidade na utilização de meio MS líquido com metade das concentrações de sais (MS/2) nas temperaturas de 15°C e 25°C (PESSOTTI, 2010).

A conservação em sistema de crescimento lento das Bromélias *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, foi facilmente adquirida com o uso de MS/2 com a adição de Manitol em diferentes concentrações sob a temperatura de 25°C e ao fotoperíodo de 16 horas; onde o número de brotos torna-se menor com o aumento da concentração de Manitol (MOREIRA, 2008). E também, segundo este autor, usar Manitol no lugar de Sacarose como fonte de carbono, promove um menor desenvolvimento de brotos.

Tabela 1 - Média do número de brotos de *V. reitzii* sob conservação *in vitro* em relação ao meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) e em diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após quatro semanas de cultivo.

Meio de Cultura	Temperatura °C	Número de Brotos em quatro semanas
MS/2	15°C	4,8aA
MS/2 15g/L de Manitol		4,6aA
MS/2 30g/L de Manitol		5,6aA
MS/2	20°C	7,3aA
MS/2 15g/L de Manitol		5,8aA
MS/2 30g/L de Manitol		3,8aA
MS/2	25°C	4,9aA
MS/2 15g/L de Manitol		5,6aA
MS/2 30g/L de Manitol		5,2aA

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam os três diferentes meios para cada temperatura isolada. Letras maiúsculas comparam o mesmo meio nas três diferentes temperaturas.

Tabela 2 - Média do número de brotos de *V. reitzii* sob conservação *in vitro* em relação ao meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) e em diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após oito semanas de cultivo.

Meio de Cultura	Temperatura °C	Número de Brotos em oito semanas
MS/2	15°C	5,3 aA
MS/2 15g/L de Manitol		4,7 aA
MS/2 30g/L de Manitol		6,3 aB
MS/2	20°C	7,6 bB
MS/2 15g/L de Manitol		5,9 abA
MS/2 30g/L de Manitol		4,1 aA
MS/2	25°C	5,3 aA
MS/2 15g/L de Manitol		6,0 aA
MS/2 30g/L de Manitol		5,3 aAB

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam os três diferentes meios para cada temperatura isolada. Letras maiúsculas comparam o mesmo meio nas três diferentes temperaturas.

2.4.2.2 Massa fresca e altura de brotos

Passadas oito semanas de conservação, foram avaliados parâmetros como, massa fresca e altura dos brotos.

Tratando da massa fresca dos brotos, quando analisado a influência dos diferentes meios, fica visível que os brotos com maior massa fresca são encontrados no meio MS sem a presença de Manitol (MS/2), e que na presença de Manitol os brotos acabam possuindo uma menor massa fresca (Tabela 3), antes de acondicionar os brotos no sistema de conservação em crescimento lento, a massa dos mesmos apresentava média de 0,13g (Fig. 6).

Observa-se, portanto, que a presença de Manitol resulta em menor massa fresca de brotos; situação semelhante ocorre em Moreira (2008), onde os tratamentos com o uso de Manitol resultaram em brotos com menor massa, quando comparados com os tratamentos sem a presença de Manitol.

Tabela 3 - Média da massa fresca de brotos (g) de *V. reitzii* em sistema de conservação *in vitro*, cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.

Meio de Cultura	Massa fresca de Brotos (g)
MS/2	0,31 b
MS/2 15g/L de Manitol	0,20 a
MS/2 30g/L de Manitol	0,22 ab

Médias seguidas de letra diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à altura dos brotos observa-se diferença nas interações entre os diferentes meios e temperaturas (Fig. 7); onde a melhor conservação referente à altura de brotos, foram obtidas nas seguintes interações: com o meio MS/2 nas temperaturas 15°C e 20°C; com o meio MS/2 com 15g/L de Manitol nas temperaturas de 20°C e 25°C; e com o meio MS/2 com 30g/L de Manitol nas três temperaturas (15°C, 20°C e 25°C).

Comparando a ausência e a presença de Manitol, percebe-se que a presença do mesmo favorece menores alturas, tanto para *Aechmea fasciata*, quanto para *Aechmea miniata*, onde a altura é em média de 3,99 cm e 6,05 cm, respectivamente após 12 meses de cultivo (MOREIRA, 2008).

Na temperatura de 25°C maior tende a ser a altura dos brotos se comparado com as outras temperaturas avaliadas, o mesmo ocorre com o trabalho de Pessotti (2010) com *V. sucrei*, onde a altura dos brotos é maior na temperatura de 25°C em relação a temperatura de 15°C, ainda o mesmo autor mostra que, quanto maior a concentração de sais do meio MS sólido (geleificado) menor será a altura dos brotos.

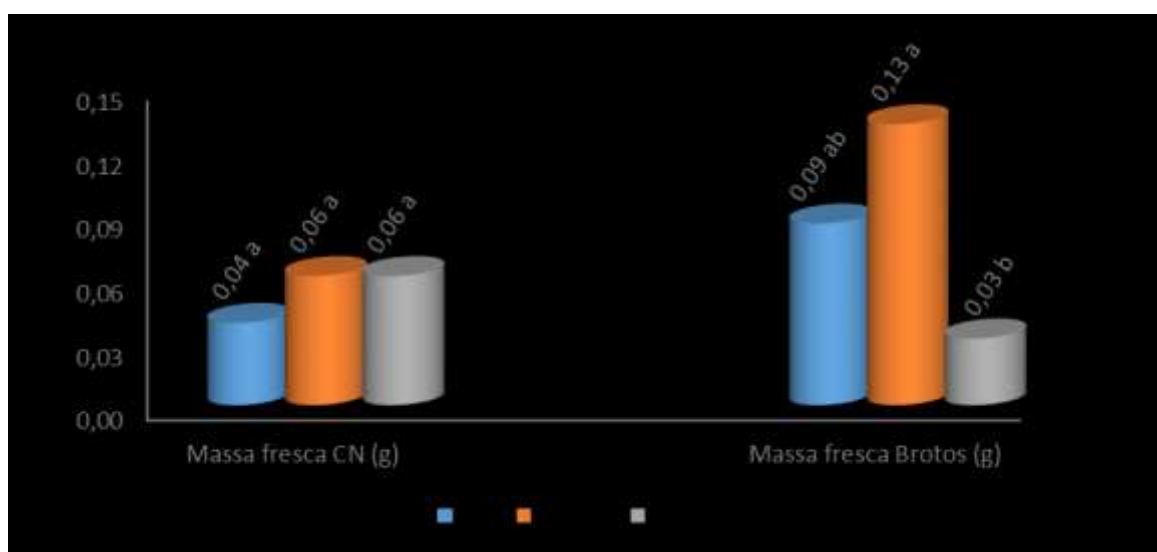


Figura 6 – Massa fresca (g) de Culturas Nodulares e de Brotos na proliferação de *Vriesea reitzzi* em diferentes meios de cultivo.

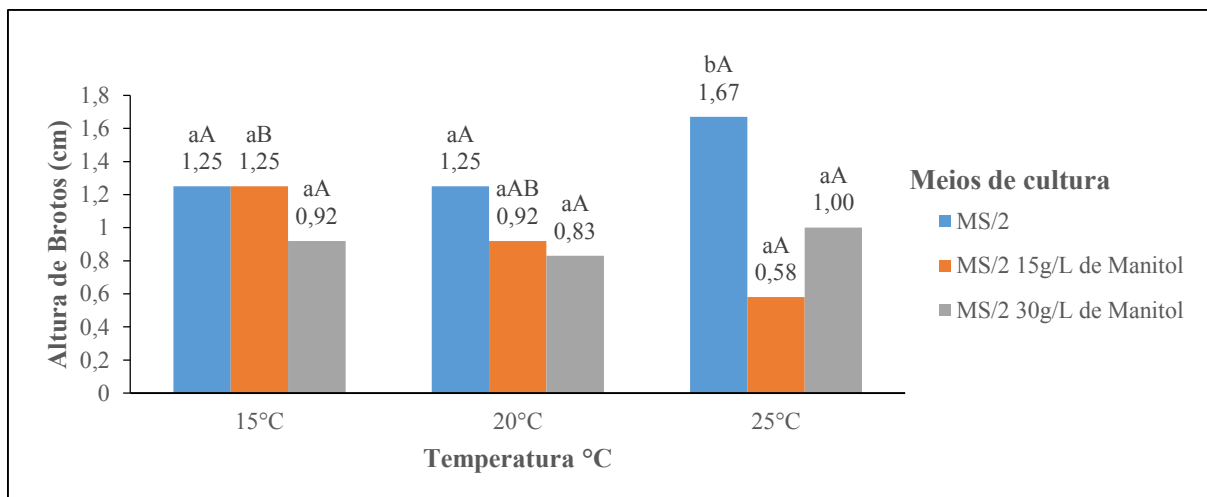


Figura 7 - Altura média dos brotos (cm) de *V. reitzii* sob conservação *in vitro* em relação ao meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) e em diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após oito semanas de cultivo. Valores com letras diferentes diferem para o teste de Tukey (5%). Letras minúsculas comparam os três diferentes meios para cada temperatura isolada. Letras maiúsculas comparam o mesmo meio nas três diferentes temperaturas.

2.5 CONCLUSÕES

A indução de culturas nodulares e microbrotos em *V. reitzii* podem ser obtidos em meios de cultura MS líquido suplementados ou não com ANA e BAP.

Microbrotos submetidos à conservação *in vitro* em crescimento lento mantiveram viáveis e com baixa proliferação de brotos, independente da temperatura e meio de cultura.

O uso do meio de cultura MS com a metade das concentrações de sais (MS/2) e adicionado de Manitol promoveu baixa produção de massa fresca dos brotos. Porém, a adição de 15g/L de Manitol, independente da temperatura resultou em baixo número de brotos. E, a manutenção das culturas em meios MS/2 com 30g/L de Manitol e em temperatura de 20°C resultou em baixa altura de brotos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.A. Fatores abióticos. In: Boldrini I.I. (org.) **Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 19–38, 2009.

ALVES, G. M. **Micropropagação e conservação de *Vriesea reitzii* e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa***. 2000. 97 p. Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2000.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 58).

BAGATINI, J. A. *Vriesea reitzii* Leme & And. Costa. UFRGS, Ilópolis- RS, 2014.

BÜNKER, H. M. *Vriesea reitzii* Leme & A.F. Costa. Bromeliaceae in Brasilia australi, 2014.

CABRAL, C. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. C. Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp. **Embrapa**, Brasília-DF, p. 7, dez. 2003.

CÂMARA, I. G.; GALINDO, L. C. **Mata Atlântica – Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica/Conservação Internacional, 2005.

CAMPANILI, M.; SCHÄFFER, W. B. **Mata Atlântica: manual de adequação ambiental**. Brasília: MMA/SBF, 2010, 96p.

CARDOSO J.C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, Araras, SP, v.32, n.4, p.383-384, 2014.

CNCFlora. *Vriesea reitzii* in **Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea reitzii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea_reitzii)>. Acesso em 26 outubro 2017.

COMPTON M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.37, p.217-242, 1994.

DAL VESCO, L. L. **Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da mata atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal**. 2010. 91 p. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6414>>. Acesso em: 18 nov. 2017

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 2010, v.589, pp.47-66.

LEDO, A. S.; SA, A. J.; SANTOS, M. A.; JUNIOR, J. F. S.; MUNIZ, A. V. C. S. Protocolo para conservação *in vitro* por crescimento lento de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Embrapa**, Aracaju, dez. 2011.

LEMO, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

MALDANER, J.; SCHWALBERT, R.; SALDANHA, C. W.; CONTERATO, I. F.; STEFFEN, G. P. K. Procedimentos para cultivo *in vitro* de *desmodium incanum*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.10, n.18; p.2533-2542, 2014.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. Dissertação submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas-Bahia, 2008.

MOREIRA, B. A.; WANDERLEY, M. G. L.; BARROS, M. A. V. C. **Bromélias: importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia**. 2006. 12 p. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente Curso de Capacitação de monitores e educadores do Instituto de Botânica – IBt. São Paulo, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p.473-497. 1962.

PESSOTTI, K. V. **Propagação e conservação *in vitro* de *Vriesea sucrei* (L.B. Smith & R.W. Read): Bromeliaceae em perigo de extinção da Mata Atlântica**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2009.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic forest. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 909-912, June 2009.

SANTOS, R. C. M. **Mata Atlântica: características, biodiversidade e a história de um dos biomas de maior prioridade para conservação e preservação de seus ecossistemas**. Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix. Belo Horizonte – MG, 2010.

SILVA, N. D. G.; DUTRA, L. F.; BIANCHI, V. J.; SOMMER, L. R.; VARGAS, D. P.; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras--MG, p.7-12, 2016.

SOARES, L. E. S. **Diversidade genética de *Vriesea reitzii* (Leme & Costa): relevância no contexto de paisagem e comparação genética com espécies relacionadas**. 2013. 63 p.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics** – A biometrical approach. 2. Ed. New York: McGraw-Hill Book Co. 1980, 633p.

WANDERLEY, M.G.L. & MARTINS, S.E. (coords.). Bromeliaceae in: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, vol. 5, p. 39-162, 2007.

3 CAPITULO 2- MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman

3.1 INTRODUÇÃO

As plantas da família Solanaceae, estão diariamente presentes nos ramos alimentícios, na área medicinal, bem como na área ornamental, por este motivo, é uma família de relevante valia nos setores econômico e comercial (GIACOMIN, 2010). Sendo também uma grande família botânica.

É uma das maiores famílias das angiospermas, abrigando 3.000 espécies distribuídas por aproximadamente 150 gêneros. O gênero *Solanum* é o de maior representatividade, onde este possui cerca de 1400 espécies. No Brasil a maior variedade de plantas de Solanaceae, são encontradas nas regiões Sudeste e Sul (FELICIANO, 2008).

Muitas espécies são utilizadas diariamente na alimentação, como *Solanum lycopersicum* L. (Tomate) e *Solanum tuberosum* L. (batata), de modo que outras espécies se destacam no setor ornamental, como é o caso das espécies presentes no gênero *Calibrachoa* (GIACOMIN, 2010).

O gênero *Calibrachoa* abrange espécies tanto de porte subarbustivo, bem como de porte herbáceo, porém geralmente seu tamanho não ultrapassa os 70 cm, é um gênero facilmente encontrado no estado de Santa Catarina e também no Rio Grande do Sul. Uma espécie muito comum deste gênero é a *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman, uma espécie popularmente conhecida como petúnia; esta é uma planta terrestre, com forma de vida em subarbusto (DILL, 2014).

A *C. sellowiana* possui um comportamento decumbente, sendo raramente subereto; ocorrendo em ambiente natural, no domínio da FOM (Fig. 8A), proporcionando ornamentação típica em ambiente de jardim (Fig. 8B). Seu caule é de base lenhosa, com uma coloração que varia entre marrom e cinza; suas folhas são sésseis, aonde chega a uma altura de 25 a 35cm (Fig. 8D) e a espécie têm uma inflorescência de coloração que varia entre magenta e roxa (Fig. 8B; E) (FLORA DO BRASIL, 2017).

A espécie tem potencial ornamental e está amplamente presente no Planalto Catarinense, sendo muito comum sua presença em municípios como, Curitiba, Campos Novos, Bom Retiro, Lages, Água Doce e São Joaquim (DILL, 2014).

A conservação desta espécie assim como da espécie anteriormente relatada, é algo de grande valia para a flora nativa, onde a micropropagação pelo cultivo *in vitro* é uma excelente ferramenta de conservação.



Figura 8. Cultivo e conservação *in vitro* de espécies da flora nativa do Planalto Catarinense: **A)** Comportamento decumbente de *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman **B)** Planta matriz em jardim da UFSC/Campus de Curitibanos; **C)** Matriz de *C. sellowiana* em vaso e mantida em casa de vegetação; **D)** Folhas sésseis *C. sellowiana*; **E)** Flor de *C. sellowiana*; **F-G)** Sistema de conservação *in vitro* por crescimento lento: **F)** Brotos de *C. sellowiana* **G)** Brotos de *C. sellowiana* com necrose. **H)** Indução *C. sellowiana* de microbrotos e CNs de *C. sellowiana* em MS suplementado com ANA (1µM) mais BAP (2µM); Barra: B=10 cm; C, F-H = 1,0 cm. **Fonte:** fotos A e E: Verdi (2012); B-D e F-H: Autor.

MATERIAL E MÉTODOS

As saídas de campo para identificação e coleta de *Petúnia-Calibrachoa sellowiana* (Fig.8A) foram em regiões de domínio da Floresta Ombrófila Mista (FOM), junto a UFSC/Campus de Curitibanos (Fig. 8B). As mudas foram acondicionadas em vasos e cultivadas em casa de vegetação aclimatizada (Fig. 8C), com controle de temperatura e umidade e manejo.

Após as mudas de *Calibrachoa sellowiana* já estarem com bom desenvolvimento servindo como planta matriz (Fig.8C), teve início o trabalho no Laboratório de Biotecnologia e Genética no Campus de Curitiba/UFSC.

O meio de cultura básico utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962); adicionado 30g/L de sacarose e pH ajustado para 5,8. Em cada tubo de ensaio (18x150 mm) foi transferido 10 ml de meio de cultura e quando de consistência líquida, utilizou-se ponte de papel filtro e para o meio geleificado, adicionou-se 7,5 g/L de ágar-ágar (Guerra; Dal Vesco, 2010). Após foram vedados com papel alumínio e filme plástico, em seguida foram autoclavados a 121 °C, a 1,3 atm., por 15-20 minutos. Após a inoculação as culturas foram mantidas em câmara de crescimento, a temperatura de 25°C sob fotoperíodo de 16 horas.

3.1.1 Ensaio de indução e proliferação das culturas

Segmentos nodais com gemas apicais e axilares, extraídas de ramos jovens de *C. sellowiana* serviram de explantes; em laboratório, os explantes foram desinfestados com prévia lavagem com água corrente e sabão neutro (Tween 20) por 5 min.

Em seguida, em câmara de fluxo, os segmentos nodais de *C. sellowiana* foram imersos em álcool 70%, por 30 seg., seguida da imersão em solução de água sanitária comercial a 40% (1% NaOCl) por 15 min, de acordo com a metodologia utilizada por Dill (2014). Por sequência, os segmentos nodais, passaram pela tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Segmentos nodais de *C. sellowiana* foram inoculados em diferentes meios de cultura. O delineamento experimental foi o completamente ao acaso (DIC) com três tratamentos: 1) Meio MS isento de fitorreguladores=MS; 2) MS suplementado com BAP (1µM) = MSB1 e 3) MS suplementado com ANA (1µM) + BAP (2µM) = MSA1B2.

Cada unidade experimental foi constituída por cinco tubos com um explante cada e três repetições, totalizando de 45 tubos de ensaio. Dados de porcentagem de indução de culturas nodulares (CN) e número de microbrotos foram obtidos após quatro semanas de cultivo. Por mais três semanas as culturas foram repicadas para o meio MSA1B2 para promover a proliferação dos microbrotos, totalizando sete semanas em cultivo.

3.1.2 Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento

Os microbrotos obtidos foram a fonte de explantes para o ensaio de conservação *in vitro*, em sistema de crescimento lento. O desenho experimental foi um fatorial 3x3, com 9

tratamentos: Microbrotos de *C. sellowiana* cultivados em três meios de cultura (MS/2=com a metade das concentrações de sais; MS/2 +15g/L de Manitol e MS/2 +30g/L de Manitol) e combinados com a incubação em três diferentes temperaturas de cultivo (15°C; 20°C e 25°C). Todas as culturas foram mantidas em ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz. Cada unidade experimental foi constituída de três tubos de ensaio contendo de 2-3 microbrotos em um delineamento em blocos ao acaso (DBC) com três repetições.

Dados de viabilidade das brotações e número de microbrotos foram obtidos após quatro semanas de cultivo. E após oito semanas de cultivo, foram coletados novamente dados de viabilidade e números de brotações e além disso também foram obtidos os dados de massa fresca de brotos e altura de brotos, bem como o número de nós por broto.

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados quantitativos, coletados de cada parâmetro foram compilados em planilhas do Excel e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade; sendo que quando necessário os dados originais foram transformados em $\log(x+1)$ ou $(x+0,5)^{0,5}$ e então submetidos à análise da variância; em sequência foi realizado a comparação das médias pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) ou em alguns casos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o software estatístico ASSISTAT, tais análises de acordo com as recomendações de Steel; Torrie (1980) e Compton (1994).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Ensaio de indução e proliferação das culturas

Para a espécie *C. sellowiana*, observou-se que, o meio de cultura MS suplementado com ANA (1 μ M) mais BAP (2 μ M) resultou nos melhores resultados, para ambos os parâmetros avaliados, ou seja, maior e significativa ($p<0,05$) porcentagem média de indução de CN (42,5%), por segmento nodal (Fig.9) e em média 2,0 brotos/explantes (Fig. 8F), em quatro semanas após a inoculação (Fig. 10).

O uso do meio de cultura MS suplementado com a combinação de ANA (0,1 μ M) com BAP (1,0 μ M) promoveu alta produção de brotos e, também foram observados a indução de culturas nodulares (DILL; DAL VESCO, 2015). Foram obtidos acima de 20 brotos/explante

com a combinação de ANA (0,1 μ M) com BAP (1,0 μ M) em quatro semanas de cultivo (DILL, 2014).

Tal ocorrido chama a atenção, pois a utilização de menores concentrações de ANA e BAP, resultaram em dez vezes mais brotos em relação aos resultados obtidos no presente trabalho. Logo seria de grande valia efetuar novos ensaios de micropropagação para verificar se de fato é possível obter um maior número de brotos de *C. sellowiana*, com o uso de menores concentrações de fitorreguladores sobre o meio MS, o que representaria um menor gasto de material.

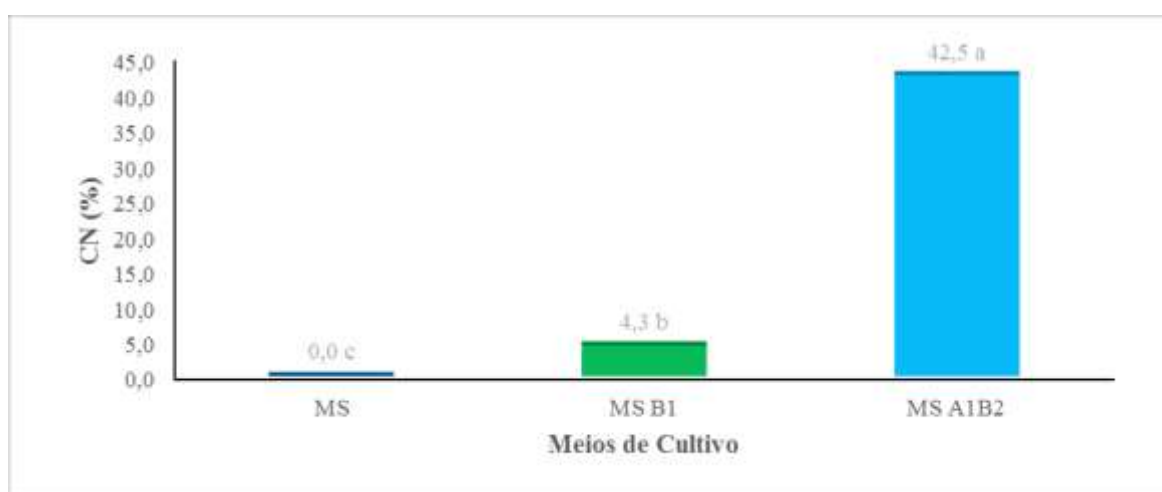


Figura 9 - Porcentagem média de indução de CN por explante de *C. sellowiana*, em relação aos diferentes meios de cultura utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; MSB1=MS + BAP (1 μ M) e MSA1B2=MS + ANA (1 μ M) + BAP (2 μ M), em sete semanas de cultivo em relação ao meio de origem. * Valores com letras diferentes diferem para o teste SNK (5%). CV (%)= 37,72; dados transformados em Log (x+2).

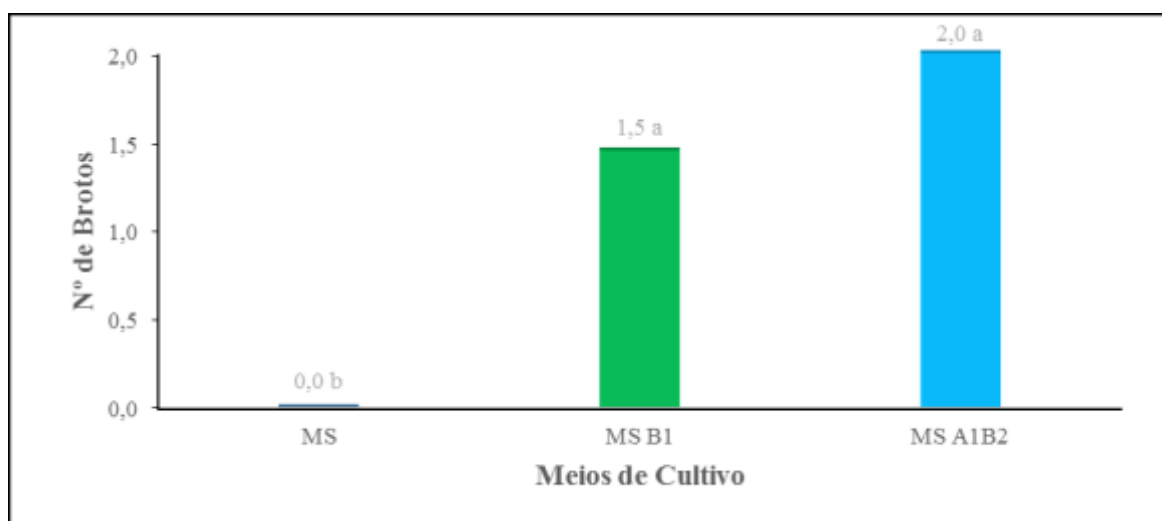


Figura 10 - Número médio de brotos por explante de *C. sellowiana* em relação aos diferentes meios na cultura: utilizados: MS=MS isento de fitorreguladores; MSB1=MS + BAP (1 μ M) e MSA1B2=MS + ANA (1 μ M) + BAP (2 μ M), em sete semanas de cultivo em relação ao meio de origem. * Valores com mesma letra não diferem para o teste SNK (5%). CV (%)= 22,97; dados transformados em Log (x+2).

3.3.2 Ensaio de conservação dos microbrotos em crescimento lento

3.3.2.1 Viabilidade e número de brotos

Para a espécie *C. sellowiana*, o sistema de conservação *in vitro*, em crescimento lento utilizado, resultou em menor capacidade de adaptação e viabilidade dos microbrotos (Tabela 4). Observou-se que, em relação aos três meios de cultura, com a metade das concentrações de sais, com a adição de manitol e nos três ambientes de temperatura há a presença necrose nas folhas (Fig.8G). O uso de Manitol e/ou Sorbitol, pode ser tóxico para determinadas espécies (LEMOS et al., 2002).

Tabela 4 - Viabilidade média das folhas *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após quatro e oito semanas de cultivo.

Meio de Cultura	Temperatura °C	Necrose*		Viabilidade (%)	
		Quatro semanas	Oito semanas	Quatro semanas	Oito semanas
MS/2	15°C	2,3aA	1,9aA	67,5	77,5
MS/2 15g/L de Manitol		2,9aA	3,0aA	52,5	50,0
MS/2 30g/L de Manitol		3,6aA	4,0aA	35,0	25,0
MS/2	20°C	2,6aA	2,1aA	60,0	72,5
MS/2 15g/L de Manitol		2,9aA	2,6aA	52,5	60,0
MS/2 30g/L de Manitol		2,4aA	2,7aA	65,0	57,5
MS/2	25°C	3,3aA	3,3aA	42,5	42,5
MS/2 15g/L de Manitol		3,1aA	3,3aA	47,5	42,5
MS/2 30g/L de Manitol		3,0aA	4,2aA	50,0	20,0

* Necrose em **Notas de 1-5**: 1= folhas com 0% de necrose; a 5= folhas com 100% de necrose. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam os três diferentes meios para cada temperatura isolada. Letras maiúsculas comparam o mesmo meio nas três diferentes temperaturas.

Com oito semanas de conservação, em algumas situações ocorreu melhorias na viabilidade, muito em função do desenvolvimento de novos brotos saudáveis, porém algumas situações pioraram e outras se mantiveram (Tabela 4).

Entre as temperaturas, a que apresenta maior viabilidade é a de 20°C (Tabela 5) e dentre os meios, o meio MS sem Manitol é o que tem maior viabilidade (Tabela 6).

Nos estudos desenvolvidos por Lemos et al. (2002), temperaturas abaixo de 15°C reduzem significativamente a viabilidade dos explantes e em 25°C o período máximo de conservação sem que haja um novo cultivo é de três meses; também relata que concentrações

de sacarose de 10 ou 20 g/L apresentaram as melhores viabilidades onde maiores concentrações de sacarose na presença ou não de Manitol, tendem a oxidar o meio de cultivo, bem como favorecer a deterioração das culturas.

Na temperatura de 18°C utilizar concentrações de 15 e 30 g/L de sacarose, bem como combinar 15 g/L de sacarose e 15 g/L de Manitol, apresentam viabilidade dos explantes de até 90%, onde aumentando as concentrações de sacarose e ou Manitol, menor será a viabilidade; já à 25°C isto se torna mais limitante, de modo que somente 15 g/L de sacarose sem a presença de manitol terá viabilidade superior a 80% (BRITO et al., 2011).

Na conservação *in vitro* de mangabeira, a presença 10 ou 20 g/L de sorbitol e a ausência de sacarose, favoreceu viabilidade por maior período de tempo (SANTOS, et al., 2011).

Quando comparado o número de microbrotos de *C. sellowiana*, a temperatura de 15°C e 25°C resultaram num menor desenvolvimento de microbrotos com quatro semanas de cultivo, porém quando já passadas oito semanas de cultivo, o menor número de brotos, manteve-se somente com a temperatura de 25°C (Tabela 7). E com a esta mesma espécie, os diferentes meios não apresentaram diferença significativa (Fig. 11).

Na presença de 15g/L de Manitol, o menor número de brotos é obtido quanto maior for a concentração de sacarose, isso à 18°C, já na mesma concentração sobre a temperatura de 25°C o mesmo não é possível, pois os explantes tornam-se inviáveis (BRITO et al., 2011).

No trabalho de Santos et al. (2011) o número de brotações foi menor na ausência de sacarose e na presença de sorbitol.

Brito et al. (2011) em resumo destaca que, o uso de agentes osmóticos favorece o crescimento das plantas de forma mais lenta, porém podem também favorecer a perda de viabilidade.

Tabela 5 - Viabilidade média das folhas *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C) após oito semanas de cultivo.

Temperatura °C	Necrose*	Viabilidade (%)
15°C	3,0 ab	50,0
20°C	2,4 a	65,0
25°C	3,6 b	35,0

*Necrose em **Notas de 1-5**: 1= folhas com 0% de necrose; a 5= folhas com 100% de necrose. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Viabilidade média das folhas *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.

Meio de Cultura	Necrose*	Viabilidade (%)
MS/2	2,4 a	65,0
MS/2 15g/L de Manitol	3,0 ab	50,0
MS/2 30g/L de Manitol	3,6 b	35,0

*Necrose em Notas de 1-5: 1= folhas com 0% de necrose; a 5= folhas com 100% de necrose. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 7 - Média do número de microbrotos de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro*, relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), após quatro e oito semanas de cultivo.

Temperatura °C	Número de Brotos em quatro semanas	Número de Brotos em oito semanas
15°C	3,1ab	5,3 b
20°C	3,3b	4,8 b
25°C	2,4a	2,5 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

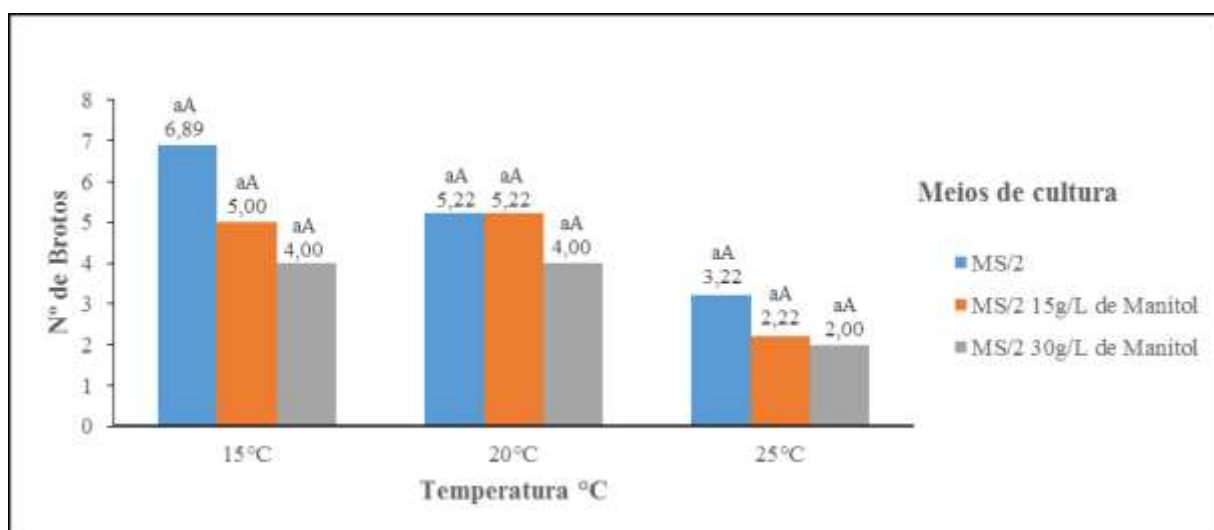


Figura 11 - Média do número de microbrotos de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro*, relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam os três diferentes meios para cada temperatura isolada. Letras maiúsculas comparam o mesmo meio nas três diferentes temperaturas.

3.3.2.2 Massa fresca, altura e número de nós por broto

Passadas oito semanas de conservação, foram avaliados parâmetros como, massa fresca e altura dos brotos e número médio de nós por broto.

Quanto as temperaturas, a menor massa fresca dos brotos é encontrada à 15°C e 25°C (Tabela 8) e em relação aos meios de cultura a menor massa fresca está presente no meio MS/2 com 15g/L e 30g/L de Manitol (Tabela 9).

Tabela 8 - Média da massa fresca de brotos (g) de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C) após oito semanas de cultivo.

Temperatura °C	Massa Fresca de Brotos (g)
15°C	0,53 ab
20°C	0,56 b
25°C	0,32 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Média da massa fresca de brotos (g) de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.

Meio de Cultura	Massa Fresca de Brotos (g)
MS/2	0,60 b
MS/2 15g/L de Manitol	0,47 ab
MS/2 30g/L de Manitol	0,35 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

É visível que o número médio de nós por broto não resultou em diferença significativa entre os diferentes meios e/ou temperaturas (Fig. 12).

Em Santos et al. (2011) em um trabalho com a mangabeira, é possível ver que utilizando 15g/L de Sacarose, assim como no presente trabalho, e além disso usando sorbitol nas concentrações de 10, 20 e 40g/L, quanto maior a concentração de sorbitol, menor foi o número de nós por brotação.

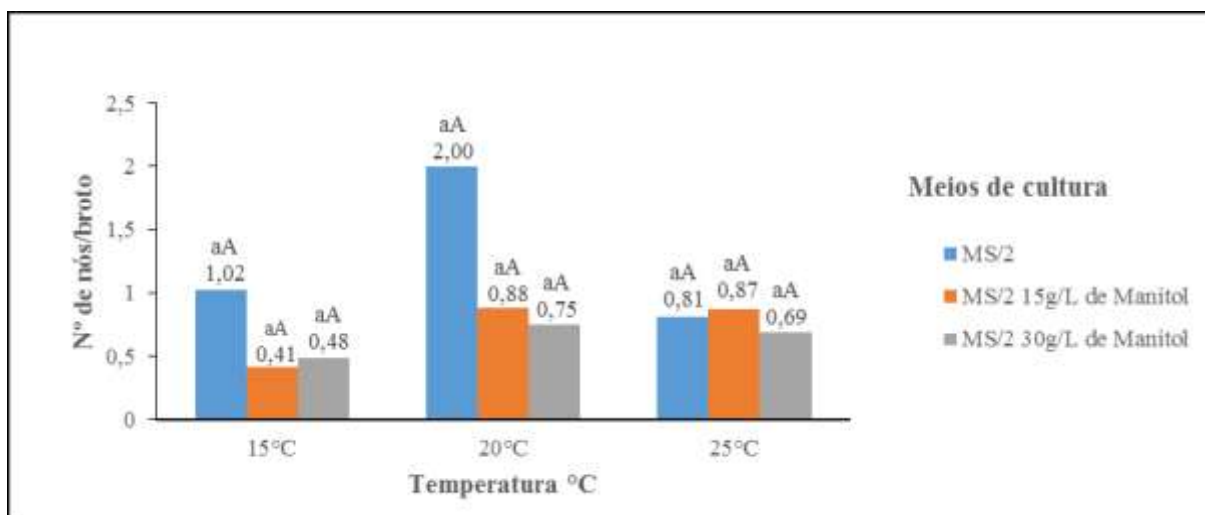


Figura 12 - Média do número de nós por broto de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro*, em relação às diferentes temperaturas de ambiente (15; 20 e 25 °C), cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No que diz respeito à altura dos brotos, não existe diferença significativa em função das temperaturas testadas (Dados não mostrados), porém observa-se que diante dos diferentes meios de cultura testados, quando o Manitol está presente no meio MS/2, menor é a altura dos brotos (Tabela 10).

Comparando a presença com a ausência de Manitol, fica claro que a presença de Manitol resulta em menores alturas de brotos, tanto para 18°C quanto para 25°C (BRITO et al., 2011).

Tabela 10 - Média da altura dos brotos (cm) de *C. sellowiana* em sistema de conservação *in vitro* cultivados em meio de cultura MS/2, na ausência ou presença de Manitol (0; 15 e 30 g/L) após oito semanas de cultivo.

Meio de Cultura	Altura de Brotos (g)
MS/2	2,8 b
MS/2 15g/L de Manitol	1,5 ab
MS/2 30g/L de Manitol	1,1 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 CONCLUSÕES

A maior indução de culturas nodulares e a melhor proliferação de microbrotos para a espécie *C. sellowiana* foi obtida em meio de cultura MS suplementado com 1 μ M de ANA e 2 μ M de BAP.

Na conservação *in vitro* em crescimento lento, a viabilidade da *C. sellowiana* foi afetada pela presença de necrose nas folhas em todos os tratamentos. E o uso do meio de cultura com a adição de Manitol e ambiente de 15°C e 25°C resultou em baixo número de brotos e massa fresca dos brotos, consequentemente, em menor altura dos brotos também.

REFERÊNCIAS

BRITO, A. L.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, F. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1354-1361, ago., 2011

COMPTON M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.37, p.217-242, 1994.

DILL, L. **Estratégias de micropropagação de *Calibrachoa sellowiana* (SENDTN.) WIJSMAN e *Rosmarinus officinalis* L.** 2014. 29 p. Trabalho de conclusão de curso submetido ao Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina. Curitiba, 2014.

DILL, L.; DAL VESCO, L. L. **Estratégias de micropropagação de *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman.** In: XVI Encontro de Botânicos do Rio Grande do Sul e VIII Encontro Estadual de Herbários, 2015, Erechim-RS. Anais Erechim-RS: EdiFAPES, 1015. p. 35-35.

FELICIANO, E. A. **Solanaceae A. Juss. Da Serra Negra, Rio Preto, Minas Gerais: tratamento taxonômico e similaridade florística.** 2008. 135 p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais da Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2008.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6414>>. Acesso em: 18 nov. 2017.

GIACOMIN, L. L. **Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Solanum* Sect. *Gonatotrachelum* Bitter (Solanoideae, Solanaceae) no Brasil.** 2010. 121 p. Dissertação apresentada ao

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 2010, v.589, pp.47-66.

LEMOES, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p.473-497. 1962.

SANTOS, R. C. M. **Mata Atlântica: características, biodiversidade e a história de um dos biomas de maior prioridade para conservação e preservação de seus ecossistemas**. Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix. Belo Horizonte – MG, 2010.

SANTOS, M. C.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JUNIOR, J. F.; Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, jul-set, 2011

SILVA, N. D. G.; DUTRA, L. F.; BIANCHI, V. J.; SOMMER, L. R.; VARGAS, D. P.; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras--MG, p.7-12, 2016.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics – A biometrical approach**. 2. Ed. New York: McGraw-Hill Book Co. 1980, 633p.

VERDI, M. ***Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman**. UFRGS, Muitos Capões- RS, 2012.

APÊNDICE A – Exemplar da Planilha utilizada para a avaliação da indução e proliferação de *Vriesea reitzii* nos diferentes meios de cultivo utilizados.

Planilha de Avaliação de <i>Vriesea reitzii</i> 28 dias após a inoculação						
Data: 26/maio/2017		28 dias (4 semanas) após a inoculação				
Tratamento (meio)	Repetição	Repetição.Frasco	CN (%)	Peso fresco CN (g)	Nº de Brotos	Peso fresco Brotos (g)
MS	R1	1.1				
	R1	1.2				
	R1	1.3				
	R1	1.4				
	R1	1.5				
Média						
MS A4	R1	1.1				
	R1	1.2				
	R1	1.3				
	R1	1.4				
	R1	1.5				
Média						
MS A2B4	R1	1.1				
	R1	1.2				
	R1	1.3				
	R1	1.4				
	R1	1.5				
Média						
MS	R2	2.1				
	R2	2.2				
	R2	2.3				
	R2	2.4				
	R2	2.5				
Média						
MS A4	R2	2.1				
	R2	2.2				
	R2	2.3				
	R2	2.4				
	R2	2.5				
Média						
MS A2B4	R2	2.1				
	R2	2.2				
	R2	2.3				
	R2	2.4				
	R2	2.5				
Média						
MS	R3	3.1				
	R3	3.2				
	R3	3.3				
	R3	3.4				
	R3	3.5				
Média						
MS A4	R3	3.1				
	R3	3.2				
	R3	3.3				
	R3	3.4				
	R3	3.5				
Média						
MS A2B4	R3	3.1				
	R3	3.2				
	R3	3.3				
	R3	3.4				
	R3	3.5				
Média						

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de *Vriesea reitzii* nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 4 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.

Planilha de Avaliação de <i>Vriesea reitzii</i> 28 dias após o acondicionamento para conservação 15°C						
Data: 28 de agosto			28 dias (4 semanas) após acondicionar em conservação			
Tratamento (meio)	Repetição	Repetição.Frasco	Nº de Brotos	Aspecto		
MS/2	R1	1.1	3	Viável		
	R1	1.2	8	Viável		
	R1	1.3	2	Viável		
	R1	1.4	2	Viável		
	Média		3,75			
MS/2 M15	R1	1.1	6	Viável		
	R1	1.2	5	Viável		
	R1	1.3	6	Viável		
	R1	1.4	2	Viável		
	Média		4,75			
MS/2 M30	R1	1.1	4	Viável		
	R1	1.2	6	Viável		
	R1	1.3	6	Viável		
	R1	1.4	8	Viável		
	Média		6,00			
MS/2	R2	1.1	7	Viável		
	R2	1.2	6	Viável		
	R2	1.3	6	Viável		
	R2	1.4	5	Viável		
	Média		6,00			
MS/2 M15	R2	1.1	2	Viável		
	R2	1.2	6	Viável		
	R2	1.3	7	Viável		
	R2	1.4	2	Viável		
	Média		4,25			
MS/2 M30	R2	1.1	5	Viável		
	R2	1.2	4	Viável		
	R2	1.3	10	Viável		
	R2	1.4	9	Viável		
	Média		7,00			
MS/2	R3	1.1	5	Viável		
	R3	1.2	6	Viável		
	R3	1.3	3	Viável		
	R3	1.4	4	Viável		
	Média		4,50			
MS/2 M15	R3	1.1	4	Viável		
	R3	1.2	5	Viável		
	R3	1.3	6	Viável		
	R3	1.4	4	Viável		
	Média		4,75			
MS/2 M30	R3	1.1	4	Viável		
	R3	1.2	5	Viável		
	R3	1.3	4	Viável		
	R3	1.4	2	Viável		
	Média		3,75			

Fonte: Elaborado pelo Autor

APÊNDICE C – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de *Vriesea reitzii* nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 8 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.

Planilha de Avaliação de <i>Vriesea reitzii</i> 60 dias após o acondicionamento para conservação 15°C						
Data: 03 de outubro		60 dias (8 semanas) após acondicionar em conservação				
Tratamento (meio)	Repetição	Repetição.Frasco	Nº de Brotos	Aspecto	Peso Fresco Brotos (g)	Altura (cm)
MS/2	R1	1.1	3	Vível	0,19	1,5
	R1	1.2	11	Vível	0,31	0,5
	R1	1.3	2	Vível	0,11	1,5
	R1	1.4	2	Vível	0,17	1,5
	Média		4,50		0,20	1,25
MS/2 M15	R1	1.1	6	Vível	0,22	0,5
	R1	1.2	5	Vível	0,15	1,5
	R1	1.3	6	Vível	0,17	0,5
	R1	1.4 contaminado	2	inVível	0	1,5
	Média		4,75		0,18	1,00
MS/2 M30	R1	1.1	5	Vível	0,16	0,5
	R1	1.2	8	Vível	0,14	0,5
	R1	1.3	6	Vível	0,29	1,5
	R1	1.4	11	Vível	0,25	0,5
	Média		7,50		0,21	0,75
MS/2	R2	1.1	9	Vível	0,17	0,5
	R2	1.2	7	Vível	0,41	1,5
	R2	1.3	6	Vível	0,1	0,5
	R2	1.4	5	Vível	0,29	1,5
	Média		6,75		0,24	1,00
MS/2 M15	R2	1.1	3	Vível	0,24	1,5
	R2	1.2	6	Vível	0,27	1,5
	R2	1.3	7	Vível	0,25	1,5
	R2	1.4	2	Vível	0,14	1,5
	Média		4,50		0,23	1,50
MS/2 M30	R2	1.1	5	Vível	0,22	1,5
	R2	1.2	4	Vível	0,47	2,5
	R2	1.3	10	Vível	0,28	0,5
	R2	1.4	9	Vível	0,22	0,5
	Média		7,00		0,30	1,25
MS/2	R3	1.1	6	Vível	0,27	0,5
	R3	1.2	6	Vível	0,47	1,5
	R3	1.3	3	Vível	0,29	1,5
	R3	1.4	4	Vível	0,35	2,5
	Média		4,75		0,35	1,50
MS/2 M15	R3	1.1	4	Vível	0,23	1,5
	R3	1.2	5	Vível	0,35	1,5
	R3	1.3	6	Vível	0,27	1,5
	R3	1.4	4	Vível	0,23	0,5
	Média		4,75		0,27	1,25
MS/2 M30	R3	1.1	5	Vível	0,13	1,5
	R3	1.2	5	Vível	0,23	0,5
	R3	1.3	6	Vível	0,27	0,5
	R3	1.4	2	Vível	0,06	0,5
	Média		4,50		0,17	0,75

Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE D – Planilha utilizada para a avaliação da indução e proliferação de *Calibrachoa sellowiana* nos diferentes meios de cultivo utilizados.

Planilha de Avaliação de <i>Calibrachoa Sellowiana</i> 52 dias após a inoculação						
Data: 07 de julho		52 dias (7 semanas) após a inoculação				
Tratamento (meio)	Repetição	Repetição.Frasco	CN (%)	Peso fresco CN (g)	Nº de Brotos	Peso fresco Brotos (g)
MS	R1	1.1				
	R1	1.2				
	R1	1.3				
	R1	1.4				
	R1	1.5				
Média						
MS B1	R1	1.1				
	R1	1.2				
	R1	1.3				
	R1	1.4				
	R1	1.5				
Média						
MS A1B2	R1	1.1				
	R1	1.2				
	R1	1.3				
	R1	1.4				
	R1	1.5				
Média						
MS	R2	2.1				
	R2	2.2				
	R2	2.3				
	R2	2.4				
	R2	2.5				
Média						
MS B1	R2	2.1				
	R2	2.2				
	R2	2.3				
	R2	2.4				
	R2	2.5				
Média						
MS A1B2	R2	2.1				
	R2	2.2				
	R2	2.3				
	R2	2.4				
	R2	2.5				
Média						
MS	R3	3.1				
	R3	3.2				
	R3	3.3				
	R3	3.4				
	R3	3.5				
Média						
MS B1	R3	3.1				
	R3	3.2				
	R3	3.3				
	R3	3.4				
	R3	3.5				
Média						
MS A1B2	R3	3.1				
	R3	3.2				
	R3	3.3				
	R3	3.4				
	R3	3.5				
Média						
MS	R4	4.1				
	R4	4.2				
	R4	4.3				
	R4	4.4				
	R4	4.5				
Média						
MS B1	R4	4.1				
	R4	4.2				
	R4	4.3				
	R4	4.4				
	R4	4.5				
Média						
MS A1B2	R4	4.1				
	R4	4.2				
	R4	4.3				
	R4	4.4				
	R4	4.5				
Média						

Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE E – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de *Calibrachoa sellowiana* nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 4 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.

Planilha de Avaliação de <i>Calibrachoa sellowiana</i> 28 dias após o acondicionamento para conservação 15°C						
Data: 28 de agosto		28 dias (4 semanas) após acondicionar em conservação				
Tratamento (meio)	Repetição	Repetição.Frasco	Nº de Brotos	Viabilidade (Notas 1-5)		
MS/2	R1	1.1	3	2,00		
	R1	1.2	4	2,00		
	R1	1.3	2	4,00		
	Média		3,00	2,67		
MS/2 M15	R1	1.1	1	4,00		
	R1	1.2	1	2,00		
	R1	1.3	2	3,00		
	Média		1,33	3,00		
MS/2 M30	R1	1.1	4	2,00		
	R1	1.2	1	5,00		
	R1	1.3	5	4		
	Média		3,33	3,67		
MS/2	R2	1.1	4	3,00		
	R2	1.2	3	2,00		
	R2	1.3	2	4,00		
	Média		3,00	3,00		
MS/2 M15	R2	1.1	3	3,00		
	R2	1.2	5	1,00		
	R2	1.3	3	3,00		
	Média		3,67	2,33		
MS/2 M30	R2	1.1	2	3,00		
	R2	1.2	3	5,00		
	R2	1.3	4	4,00		
	Média		3,00	4,00		
MS/2	R3	1.1	5	1,00		
	R3	1.2	4	2,00		
	R3	1.3	4	1,00		
	Média		4,33	1,33		
MS/2 M15	R3	1.1	4	3,00		
	R3	1.2	2	4,00		
	R3	1.3	3	3,00		
	Média		3,00	3,33		
MS/2 M30	R3	1.1	3	2,00		
	R3	1.2	3	4,00		
	R3	1.3	4	3,00		
	Média		3,33	3,00		

Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE F – Dados da avaliação de conservação em crescimento lento de *Calibrachoa sellowiana* nos diferentes meios testados, na temperatura de 15°C após 8 semanas de acondicionamento. O mesmo modelo planilha foi utilizado para as outras temperaturas.

Planilha de Avaliação de <i>Calibrachoa sellowiana</i> 60 dias após o acondicionamento para conservação 15°C							
Data: 03 de outubro		60 dias (8 semanas) após acondicionar em conservação					
Tratamento (meio)	Repetição	Repetição.Frasco	Nº de Brotos	Viabilidade dia 03/10	Peso Fresco Brotos (g)	Nº Nós/Broto	Altura (cm)
MS/2	R1	1.1	5	2,00	0,42	0,4	0,5
	R1	1.2	6	2,00	0,75	1	2,5
	R1	1.3	12	3,00	1,06	0	0,5
	Média		7,67	2,33	0,74	0,47	1,17
MS/2 M15	R1	1.1	3	4,00	0,19	0	0,5
	R1	1.2	5	2,00	0,41	0,4	1,5
	R1	1.3	3	4,00	0,44	0,3	1,5
	Média		3,67	3,33	0,35	0,23	1,17
MS/2 M30	R1	1.1	5	3,00	0,52	0,2	1,5
	R1	1.2	1	5,00	0,41	0	0,5
	R1	1.3	7	3	0,44	0,3	1,5
	Média		4,33	3,67	0,46	0,16	1,17
MS/2	R2	1.1	6	3,00	0,52	0	1,5
	R2	1.2	4	1,00	0,72	2,5	2,5
	R2	1.3	8	3,00	0,91	0,5	2,5
	Média		6,00	2,33	0,72	1,00	2,17
MS/2 M15	R2	1.1	4	3,00	0,39	0,5	1,5
	R2	1.2	6	2,00	0,51	0,3	1,5
	R2	1.3	3	2,00	0,42	0,7	1,5
	Média		4,33	2,33	0,44	0,50	1,50
MS/2 M30	R2	1.1	3	4,00	0,23	1	0,5
	R2	1.2	5	5,00	0,26	1,4	1,5
	R2	1.3	4	4,00	0,2	1	1,5
	Média		4,00	4,33	0,23	1,13	1,17
MS/2	R3	1.1	7	1,00	0,88	1,57	4,5
	R3	1.2	9	1,00	1,18	0,44	3,5
	R3	1.3	5	1,00	0,56	2,8	5,5
	Média		7,00	1,00	0,87	1,60	4,50
MS/2 M15	R3	1.1	9	3,00	0,99	0,22	1,5
	R3	1.2	5	5,00	0,57	0,8	2,5
	R3	1.3	7	2,00	0,41	0,428	1,5
	Média		7,00	3,33	0,66	0,48	1,83
MS/2 M30	R3	1.1	6	3,00	0,72	0	1,5
	R3	1.2	5	4,00	0,29	0,4	1,5
	R3	1.3contaminado	0	5,00	0	0	0
	Média		3,67	4,00	0,34	0,13	1,00

Fonte: Elaborado pelo Autor.

**ANEXO A – Componentes do meio de cultura básico de Murashige & Skoog
(MURASHIGE; SKOOG, 1962).**

Componentes	Concentração	
	mg L ⁻¹	mM
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1.650	20,6
KNO ₃	1.900	18,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	3,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,25
Micronutrientes		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,030
H ₃ BO ₃	6,2	0,100
KI	0,83	0,0005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,0001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0001
FeEDTA		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	0,10
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	0,10
Vitaminas		
Tiamina - HCl	0,1	0,0003
Piridoxina - HCl	0,5	0,0024
Ácido nicotínico	0,5	0,0040
Glicina	2,0	0,0270
Mio-Inositol	100	0,05
Sacarose	30.000	87,6

Fonte: LEDO et al., 2011